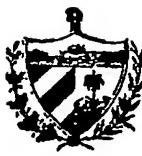


Pct/CU 03/00019

Pct/CU 03/00019



REPÚBLICA DE CUBA

REC'D	21 JAN 2004
WIPO	PCT



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora de la OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número trescientos treinta y ocho del año dos mil dos del Registro de Entrada, fue presentada en esta OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL la solicitud de Certificado de Patente de Invención, por COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS, con fecha veintisiete de diciembre de dos mil dos, a las nueve horas y cincuenta y cuatro minutos ante meridiano, por Omar López Ocejo, Representante, ciudadano cubano, a nombre y en representación de CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, cuya invención fue creada por Eulogio Pimentel Vázquez; Eddy Bover Fuentes; Roberto Basulto Baker; Jesús Junco Barranco; Franklin Fuentes Aguilar; Niurka Arteaga Moré; Lesvia Calzada Aguilera; Héctor Hernández Domínguez; Yovisleidys López Sáez; Gerardo E. Guillén Nieto y Glay Chinea Santiago.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Patente de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBÍEN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Argia Poveda Marcheco, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veintiséis días del mes de diciembre de dos mil tres.

ups
Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora
Oficina-Cubana de la Propiedad Industrial

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

RESUMEN**COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.**

5

La presente invención se refiere al campo de la inmunología, la endocrinología y la oncología, y en particular se basa en la generación de respuesta inmune, de forma combinada, hacia determinados factores de crecimiento y hormonas. Un efecto sinérgico entre factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y de hormonas involucradas en la cascada de liberación de hormonas sexuales, o de la reproducción: (GnRH, LH, FSH), descubierta aquí potencia la respuesta antitumoral, expresada como reducción de la masa tumoral y un aumento del tiempo de supervivencia.

10

Lic. Argia Roveda Marcheco
20 Representante Legal, CIGB

15



MEMORIA DESCRIPTIVA

COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.

5

La presente invención está relacionada fundamentalmente con el campo de la inmunología, la endocrinología y la oncología, y en particular a composiciones farmacéuticas que incluyen una combinación de factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y de hormonas sexuales y/o aquéllas involucradas en la cascada de liberación de hormonas sexuales, o de la reproducción, que provocan la producción de respuesta auto inmune de forma combinada para el tratamiento de neoplasias.

Estado de la técnica Anterior

15 La Hormona Liberadora de Gonadotropinas ("Gonadotropin-Releasing Hormone" en inglés, abreviado GnRH), también conocida como Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante ("Luteinizing Hormone Releasing Hormone" en Inglés, abreviado LHRH), es una hormona peptídica hipotalámica, responsable de estimular la liberación de la hormona Luteinizante ("Luteinizing Hormone" en Inglés, abreviado 20 LH) y Folículo Estimulante ("Follicle Stimulating Hormone" en Inglés, abreviado FSH) de la pituitaria anterior.

Además de la GnRH producida por el sistema hipotalámico, existen evidencias de la producción de GnRH en otros sitios del cerebro (Jennes L, Conn P.M., "Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in the rat brain". *Front Neuroendocrinol.* 1994, vol. 15, pp. 51-77), así como en células granulosas de ovario de ratas (Peng C. Fan N.C. Ligier M. Vaananen J. Leung P.C., "Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells". *Endocrinology* 1994, vol. 135, pp. 1740-1746), en células testiculares (Di Matteo L. Vallarino M. Pierantoni R., "Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary, and testis of the frog, *Rana esculenta*". *J. Exp. Zool.* 1996, vol. 247, pp. 33-40), en la placenta humana (Gohar J. Mazor M. Leiberman J. R., "GnRH in pregnancy". *Arch. Gynecol. Obstet.* 1996, vol. 259, pp. 1-6), en el sistema inmune (Jacobson J.D. Crofford L.J. Sun L. Wilder R.L., "Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in

25

30

- lymphoid organs". *Neuroendocrinology* 1998, vol. 67, pp. 117-125) y en glándula pituitaria (Bauer T.W. Moriarty C.M. Childs G.V., "Studies of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the rat anterior pituitary". *J. Histochem. Cytochem.* 1981, vol. 29, pp. 1171-1178).
- 5 Es bien conocido que la gonadectomía constituye una intervención terapéutica necesaria en el tratamiento de tumores dependientes de esteroides gonadales. Los análogos de GnRH pueden ejercer su actividad antitumoral no solo a través de la castración química, sino también por efecto directo sobre las células tumorales (Couillard S. Labrie C. Belanger A. Candas B. Pouliot F. Labrie F. "Effect of dehydroepiandrosterone and the antiandrogen EM-800 on growth of human ZR-75-1 breast cancer xenografts". *J. Nat. Cancer Inst.*, 1998, May 20, pp. 772-778; Kolle S. et al.: "Expression of growth hormone receptor in human prostatic carcinoma and hyperplasia". *Int. J. Oncol.*, 1999, vol. 14, No. 5, pp. 911-916).
- 10 Se ha reportado además, que un antagonista de GnRH (MZ-4-71) es capaz de suprimir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno independientes PC-3, DU-145 y Dunning AT-1 (A Jungwirth et al.: "Inhibition of in vivo proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone". *British Journal of Cancer*, 1997, vol. 75, No. 11, pp. 1585-1592).
- 15 20 La línea celular Dunning R3327-G ha sido utilizada ampliamente para diferentes estudios, generalmente asociados al tratamiento de tumores prostáticos, y en la actualidad constituye un modelo establecido. El receptor de EGF (EGF-R) se ha encontrado en modelos de tumores prostáticos Dunning R3327 sensibles a andrógenos (Damberg JE, Bergh A, Assarsson B, Gåfvels M. "Epidermal growth factor receptor content in rat prostatic adenocarcinoma: effects of endocrine treatment", *Urol Res* 1995; vol. 23, No.2, pp. 119-25). Se ha sugerido además, que en la sublínea Dunning R3327-G, la expresión del receptor de EGF está coordinadamente bajo el control androgénico (Coordinate loss of growth regulatory factors following castration of rats carrying the Dunning R3327 G prostatic tumor.
- 25 30 *Clin Physiol Biochem* 1992; vol. 9, No.2, pp. 47-50).
- El Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor en inglés, abreviado EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular de alrededor de 6,045 D, que estimula la proliferación de células epiteliales y mesenquimales tanto *in vitro* como *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., "Human Epidermal Growth factor:

Isolation and Chemical and Biological Properties", *PNAS USA* 1975, vol. 72, pp. 1317). Su acción es desarrollada fundamentalmente a través de receptores específicos en la membrana de dichas células. El EGF fue aislado y purificado por primera vez de glándulas submaxilares murinas (Cohen S. *J. Biol. Chem.* 1962, vol. 237, No. 1, pp. 555). Posteriormente se obtuvo una molécula similar de la orina humana (Cohen S. "Human Epidermal Growth factor: Isolation and Chemical and Biological Properties", *PNAS USA* 1975, vol. 72, pp. 1317).

La acción bio-reguladora del EGF es ejercida a través de un receptor de membrana (EGF-R), una glicoproteína de alrededor de 170 KD, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular del receptor está asociado con la actividad de una proteína tirosino kinasa específica, que muestra homología estructural al producto oncogen *v-erb-B* mostrando cierta relación hacia los procesos de transformaciones malignas (Helding C. H. *Cell* 1984, vol. 37, pp. 9-20).

La presencia del EGF-R en células de tumores ha probado ser una indicación de un pronóstico reservado en el cáncer de mama humano. Aproximadamente el 40% de los tumores de mama muestran sitios de unión específica de alta afinidad por el EGF (M.A. Rios et al.: "Receptors for Epidermal Growth Factor and Estrogen as Predictors of Relapse in Patients with Mammary Carcinoma". *Anticancer Research* 1988, vol. 8, pp. 173-176). Existe también una correlación inversa con la presencia de receptores de estrógenos señalando al EGF-R como un marcador de diferenciación o como un indicador de la capacidad potencial de proliferación de células malignas (Pérez R., Pascual M. R., Macías A., Lage A., *Breast Cancer Research and Treatment* 1984, vol. 4, pp. 189-193).

Estudios previos desarrollados en el modelo del tumor ascítico de Ehrlich en ratones Balb/C, demostraron el efecto inhibitorio *in vivo* del EGF (Lombardero J., et al. *Neoplasma* 1987, vol.33, pp. 4), sugiriendo la posibilidad de considerar esta molécula como un modificador de la respuesta biológica.

Una composición vacunal que contiene al EGF autólogo acoplado a una proteína portadora que inhibe el crecimiento de tumores dependientes de EGF a través de un efecto autoinmune, sin efectos colaterales, ha sido desarrollada (US 5,894,018: Vaccine composition comprising autologous epidermal growth factor or fragment or derivative thereof having anti-tumor activity and use thereof in the therapy of malignant diseases).

- En estudios previos se ha reportado que el tumor Dunning expresa altos niveles de ARNm para el factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor en inglés, abreviado VEGF) y sus receptores comparados con la próstata ventral (Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration, *Prostate* 1998, vol. 36, No. 2, pp. 71-79). Ensayos en modelos animales han mostrado que la privación androgénica puede conllevar a la regresión vascular y que el VEGF puede ser regulado por andrógenos. En el cáncer de próstata humano, la producción constitutiva de VEGF por el epitelio glandular fue suprimida como consecuencia de una terapia de ablación androgénica. La pérdida de VEGF conllevó a la apoptosis selectiva de las células endoteliales en vasos desprovistos de células periendoteliales (Laura E. et al.: "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal". *J. Clin. Invest.* 1999, vol. 103, No. 2, pp. 159-165).
- El VEGF es un mitógeno angiogénico y vasculogénico específico de células endoteliales y también juega su papel en la vascularización patogénica, la cual se asocia a un número de patologías clínicas, incluyendo el cáncer y la artritis reumatoidea. El VEGF es un homodímero glicosilado unido por enlaces disulfuros y es expresado en diferentes isoformas (VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206) con tallas que varían en un rango desde 121 hasta 206 residuos en humanos (Yves A. Muller, et al.: "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding". *Structure* 1997, vol. 5, No. 10, pp. 1325-1338).
- Las células tumorales por lo general muestran dependencia altamente reducida de estimulación de crecimiento exógeno y son capaces de generar muchas de sus señales propias de crecimiento. Esta independencia de señales, derivadas exógenamente, daña un mecanismo homeostático críticamente importante, que opera normalmente para asegurar el comportamiento correcto de varios tipos de células dentro de un tejido.
- Para alcanzar su autonomía en señales de crecimiento, las células han creado mecanismos que alteran las señales de crecimiento extracelular, de transductores transcelulares de esas señales o del circuito intracelular que traduce esas señales en acción (Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg: "The Hallmarks of Cancer (Review)". *Cell* 2000, vol. 100, pp. 57-70). Mientras la mayoría de los factores de

crecimiento son producidos por un tipo de células para estimular la proliferación de otras (proceso de señalización heterotípico), muchas células de cáncer adquieren la habilidad de sintetizar factores de crecimiento para los cuales ellas son respondedoras, creando un lazo de retroalimentación positiva (estimulación autocrina).

Los receptores para determinados factores de crecimiento, que generalmente portan actividad tirosino kinasa en sus dominios citoplasmáticos, están sobre-expresados en muchos tipos de células cancerosas y como consecuencia desarrollan una hiper-respuesta a concentraciones normales de los mismos. La sobre-expresión de receptores para factores de crecimiento, puede eliciar señalización independiente de ligandos. La señalización independiente de ligandos puede ser alcanzada también por alteraciones estructurales de los receptores (el receptor de EGF puede perder parte de su dominio citoplasmático y señalizar constitutivamente).

La cascada SOS-Ras-Raf-MAPK juega el papel central en la señalización por la acción de factores de crecimiento. El 25% de tumores humanos presentan problemas en la regulación de la expresión de proteínas Ras, aunque se supone que las rutas de señalización del crecimiento sufren alteraciones en todos los tumores humanos (casi la mitad de los carcinomas de colon humanos portan oncogenes ras mutados y se piensa que los restantes portan defectos en otros componentes de las rutas de señalización).

Las células normales, tales como fibroblastos y células endoteliales, pueden jugar un papel decisivo en la proliferación de las células tumorales. En un tejido normal las células son incitadas a crecer a través de las señales (paracrinias) de sus vecinas, o a través de señales sistémicas (endocrinas), por tanto, para explicar la proliferación de células tumorales hay que tener en cuenta que la señalización heterotípica entre los diversos tipos de células dentro del tumor es tan importante como los mecanismos autónomos antes mencionados. En ese sentido, el oxígeno y los nutrientes suministrados por la vasculatura son cruciales para las funciones y supervivencia de las células tumorales.

La habilidad de inducir angiogénesis sostenida parece adquirirse en uno o varios pasos discretos durante el desarrollo de tumores a través de un cambio angiogénico del estado vascular enquistado. La neovascularización es un pre-requisito para la expansión clonal asociada con la formación de tumores macroscópicos.

Se ha encontrado que el efecto mitogénico de factores de crecimiento en líneas celulares puede ser contrarrestado por análogos de GnRH, indicando una interacción de la GnRH con la ruta mitogénica de transducción de señales. Esta hipótesis fue corroborada por la demostración de la inhibición de la actividad tirosina kinasa, inducida por factores de crecimiento en células tumorales humanas de ovarios y endométrio por agonistas de GnRH, la cual se debió en parte a la activación GnRH-inducida de la fosfatasa fosfotirosina.

5 Se ha asociado el tratamiento con análogos de GnRH a una reducción marcada de receptores para factores de crecimiento (EGF; factor 1 de crecimiento de tipo insulina, IGF-1) en membrana de células tumorales; así como la disminución dramática de los niveles de ARNm para el EGF-R en tumores. Se ha reportado además actividad anti-proliferativa y cambios en la expresión de receptores para estrógenos y andrógenos en determinadas líneas tumorales.

10 Se han avanzado en las investigaciones relacionadas con el cáncer durante más de un cuarto de siglo, han propiciado la acumulación de indiscutibles evidencias, de que la tumorogénesis es un proceso dinámico de múltiples pasos. El vasto catálogo de genotipos de células malignas es una manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología de las células, dichas alteraciones rigen colectivamente el crecimiento maligno de tejidos en los distintos tipos de tumores. Por lo tanto un importante 15 problema de la terapia del cáncer aun no resuelto, es conseguir la modulación de la respuesta inmune por la vía activa o pasiva.

Explicación de la Invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, empleando una 20 nueva combinación farmacéutica que incluye factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y hormonas sexuales y/o aquéllas involucradas en la cascada de liberación de hormonas sexuales, o de la reproducción (GnRH, LH, FSH). Dicha combinación es útil para el tratamiento de neoplasias y dependiendo de las 25 circunstancias los ingredientes activos de la combinación pueden administrarse simultánea, separada o secuencialmente.

En estudios preclínicos realizados, la generación de respuesta inmune combinada hacia los factores de crecimiento y hormonas antes mencionados, ha permitido obtener mejores resultados que los observados cuando se genera respuesta inmune hacia estos factores y hormonas de forma independiente. Estos resultados

proporcionan evidencias de que este acercamiento constituye una vía más efectiva para el tratamiento de pacientes con neoplasias de diferentes orígenes ya que se potencia la respuesta antitumoral, expresada como reducción de la masa tumoral y el aumento del tiempo de supervivencia.

- 5 Mas particularmente la invención se refiere a combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias, mediante administración simultánea, separada o secuencial, las cuales comprenden un compuesto A y un compuesto B, donde A y B son seleccionadas del grupo de moléculas consistentes en:
- A: a.1. GnRH, o sus análogos, o anticuerpos anti-GnRH, o el receptor de GnRH (GnRH-R) o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o anticuerpos anti-GnRH-R, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 10 a.2. Gonadotropinas naturales o recombinantes, o sus análogos, o sus variantes mutadas, acopladas o no a una proteína portadora inmunopotenciadora, anticuerpos anti-Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- 15 a.3. Receptores de Gonadotropinas hipofisarias, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- a.4. Anticuerpos anti-receptor de Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- B: b.1. EGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de EGF o análogos de EGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 20 b.2. Anticuerpos anti-EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.3. Receptor de EGF (EGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 25 b.4. Anticuerpos anti receptor de EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.5. VEGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de VEGF o análogos de VEGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 30 b.6. Anticuerpos anti-VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- b.7. Receptores de VEGF, o sus variantes mutadas o péptidos derivados de los receptores de VEGF acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 5 b.8. Anticuerpos anti receptor de VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.9. TGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de TGF o análogos de TGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 10 b.10. Anticuerpos anti-TGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.11. Receptor de TGF (TGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados En una realización preferida, las combinaciones farmacéuticas que incluyen las moléculas de los grupos A ó B son acopladas a la proteína portadora inmunopotenciadora mediante conjugación o mediante la formación de proteínas químéricas y más específicamente dentro de las moléculas del grupo A el péptido análogo de GnRH con la secuencia pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly.
- 15 En otra materialización de la invención la proteína portadora inmunopotenciadora seleccionada puede ser una de las proteínas de la membrana externa de Neisseria meningitidis P1 y P64.o un epítope T helper del toxoide tetánico (TT).
- Asimismo la invención refiere una combinación farmacéutica donde la proteína 20 conjugada o químérica es una de las variantes siguientes:
- (b) GnRH unida a una proteína portadora y a EGF.
- (c) GnRH unida a una proteína portadora y a VEGF.
- (d) GnRH unida a una proteína portadora y a TGF.
- (e) GnRH unida a una proteína portadora a EGF y a TGF.
- 25 (f) GnRH unida a una proteína portadora a VEGF y a EGF.
- Esta invención proporciona también un método para la generación de respuesta inmune combinada el cual comprende el tratamiento con las combinaciones terapéuticas definidas en la invención, las cuales pueden ser aplicadas de forma simultánea, separada o secuencial.
- 30 La invención se describe más detalladamente a través de los siguientes procedimientos
- Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene GnRH mutada acoplada a un epítope T-helper del toxoide tetánico (D3-1), como uno de los componentes para preparaciones combinadas.**

Para alcanzar una respuesta de anticuerpos contra la GnRH se inmuniza con un péptido análogo a GnRH conjugado con una proteína portadora (*Vacuna para la inmunocastración de mamíferos, EP 0 959 079*). El péptido análogo de GnRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly) y la proteína portadora (un epítope T-helper del toxoide tetánico) fueron sintetizados químicamente usando dos residuos de glicina como separadores, por el método de fase sólida y la estrategia Boc/Bzl usando resina de "4-methyl-benzhydrolamine" (MBHA - 0.75 mmol/g, BACHEM, Swiss).

La respuesta humoral contra la GnRH puede obtenerse mediante la inmunización

activa con GnRH natural o cualquiera de sus análogos acoplados a una proteína portadora. Por otra parte los análogos de GnRH, agonistas o antagonistas, pueden ser usados como tales en preparaciones combinadas, lográndose también un efecto sinérgico de reducción de la masa tumoral debido a que del mismo modo interrumpen o dañan la señalización a través de la proteína G en las células que portan sus receptores. Anticuerpos anti-GnRH pueden utilizarse además como componentes en composiciones combinadas para generar una respuesta inmune pasiva. Las gonadotropinas hipofisarias hormona luteinizante (LH) y folículoestimilante (FSH) pudieran también ejercer un efecto sinérgico en determinados tipos de tumores si se combinan con factores de crecimiento para producir respuesta autoinmune.

Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene al Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (hrEGF) acoplado a una proteína portadora, como uno de los componentes para preparaciones combinadas.

Una solución de Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante hrEGF (National Medicament Register Office from Cuba, HEBERMIN, No.1266) en PBS/MgCL₂ 10 mM, se mezcla con una solución de la proteína portadora (P64 recombinante; proteína de membrana exterior de *Neisseria meningitidis*) en el mismo solvente, en una relación de 1 a 5 moles de hrEGF por mol de proteína. Posteriormente se adiciona glutaraldehído 0.05% hasta una concentración final de 0.05 a 0.1 %. La mezcla se incuba por un período de 1 a 3 horas a temperatura ambiente y se dializa en PBS/ MgCL₂ 10mM con al menos 3 cambios de la solución de diálisis (Vaccine composition comprising autologous epidermal growth factor or a

fragment or a derivative thereof having anti-tumor activity and use thereof in the therapy of malignant diseases, US 5,894,018).

La respuesta humoral hacia el EGF puede lograrse también mediante la inmunización con péptidos de EGF o de su receptor acoplados a una proteína

5 portadora inmunopotenciadora, o de forma pasiva, suministrando directamente anticuerpos anti-EGF o anti receptor de EGF.

El EGF comparte cerca del 30 % de su secuencia con el Factor de Crecimiento Transformante (Transforming Growth Factor en inglés, abreviado TGF) y compite con él por los mismos sitios de unión en receptores de membrana. Además, se han

10 reportado grandes cantidades de complejos *TGF alfa / receptor de EGF* en diferentes tipos de tumores humanos. Es por tanto evidente, que la respuesta humoral hacia el TGF es importante en la oncogénesis, y que es igualmente importante en el sinergismo que se describe para el EGF.

15 **Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene al Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular humano (hVEGF) acoplado a una proteína portadora, como uno de los componentes para preparaciones combinadas.**

La respuesta humoral contra el VEGF es alcanzada inmunizando con hVEGF conjugado con una proteína portadora (KLH, Keyhole limpet haemocyanin) (hVEGF-KLH). La conjugación de la isoforma hVEGF₁₂₁ a KLH se realizó utilizando el 20 proceso de acoplamiento de la carbodiimida soluble.

La respuesta humoral hacia el VEGF puede lograrse también mediante la inmunización con péptidos de VEGF o de su receptor acoplados a una proteína portadora inmunopotenciadora, o de forma pasiva, suministrando directamente anticuerpos anti-VEGF o anti receptores de VEGF.

25 **Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hrEGF.**

La preparación inmunogénica combinada se obtuvo mezclando 750 µg de D3-1 y 250 µg de hrEGF-P64 en un volumen final de 0.5 ml.

Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hVEGF.

La preparación inmunogénica combinada se obtuvo mezclando 750 µg de D3-1 y

30 100 µg de hVEGF-KLH en un volumen final de 0.5 ml.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la evaluación del tiempo de supervivencia de ratas Copenhagen implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G sometidas a diferentes tratamientos.

5

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

1. Implante de la línea tumoral R3327-G en ratas Copenhagen.

Ratas Copenhagen de 9-12 semanas (aproximadamente 100 g de peso corporal)

10 fueron implantadas con la línea celular Dunning R3327-G, utilizando una densidad celular de 2×10^6 células por animal, en medio de implante (medio de cultivo RPMI 1640, libre de suero en un volumen de 0.5 ml) en la zona laxa de los flancos. La eficiencia del prendimiento alcanzada fue del 100% de los animales a los 90 días.

2. Evaluación del tiempo de supervivencia, como criterio de actividad antitumoral, de ratas implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G bajo diferentes tratamientos.

Para el experimento se confeccionaron 8 grupos, de 10 animales cada uno, con ratas Copenhagen implantadas de la forma que se describe anteriormente.

Grupos experimentales:

- 20 1. Animales placebos (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).
 2. Animales castrados quirúrgicamente.
 3. Animales tratados con DES (dietilestilbestrol).
 4. Animales inmunizados con el péptido D3-1 (GnRHm1-TT).
 5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.
 - 25 6. Animales inmunizados con hVEGF-KLH.
 7. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.
 8. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.
- El esquema de inmunización utilizado en el tratamiento incluyó 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 dosis posterior al implante) administradas quincenalmente de:
- 30 750 µg de D3-1, 250 µg de hrEGF-P64, 100 µg de hVEGF-KLH y las combinaciones de D3-1 + hrEGF-P64 y D3-1 + hVEGF-KLH en un volumen de 0.5 ml en adyuvante oleoso (se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y adyuvante Incompleto de Freund en estimulaciones posteriores), por vía subcutánea en 4 sitios a ambos lados de la columna vertebral. En las combinaciones se

mantuvo la misma dosis de cada antígeno que la suministrada en los tratamientos independientes.

El tratamiento con DES se realizó en días alternos 3 veces por semana a razón de 1mg/kg/día durante el tiempo que duró el experimento y comenzó una vez que se

5 inocularon las células.

Las inmunizaciones comenzaron entre 30 y 45 días antes del procedimiento de implante del tumor y se prolongaron hasta completar un total de 7 inmunizaciones, de modo que la respuesta humoral en ensayos ELISA para cada uno de los antígenos, expresada en títulos de anticuerpos, estuviera por encima del valor de

10 corte para cada antígeno, antes de que se inocularan las células tumorales.

La evaluación del efecto de los tratamientos se realizó 1 vez por semana durante el período experimental (13 meses). El efecto fue evaluado como el tiempo de supervivencia de los animales en cada grupo experimental. Los datos se muestran en la figura No. 1.

15 **3. Evaluación de la reducción del tumor, como criterio de actividad antitumoral, en ratas implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G bajo diferentes tratamientos:**

Para el experimento se confeccionaron 8 grupos, de 10 animales cada uno, con ratas Copenhagen implantadas de la forma que se describe anteriormente.

20 Grupos experimentales:

1. Animales placebos (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).

2. Animales castrados quirúrgicamente.

3. Animales tratados con DES (dietilestilbestrol).

4. Animales inmunizados con el péptido D3-1 (GnRHm1-TT).

25 5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.

6. Animales inmunizados con hVEGF-KLH.

7. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.

8. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.

El esquema de inmunización utilizado en el tratamiento (igual que el anterior) incluyó

30 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 posterior al implante) administradas quincenalmente de: 750 µg de D3-1, 250 µg de hrEGF-P64, 100 µg de hVEGF-KLH y sus combinaciones en un volumen de 0.5 ml en adyuvante oleoso (se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y adyuvante Incompleto

de Freund en estimulaciones posteriores), por vía subcutánea en 4 sitios a ambos lados de la columna vertebral. En las combinaciones se mantuvo la misma dosis de cada antígeno que la suministrada en los tratamientos independientes.

El tratamiento con DES se realizó en días alternos 3 veces por semana a razón de 5 1mg/kg/día durante el tiempo que duró el experimento y comenzó una vez que se inocularon las células.

La evaluación del experimento se realizó al sacrificio (3 meses después de realizado el implante de la línea tumoral). Para evaluar el efecto de cada tratamiento, el tumor fue resecado y pesado en balanza técnica. El efecto del tratamiento ($E_{Tratamiento}$) se

10 consideró como la unidad menos la relación de la media del peso de los tumores en los animales tratados ($P_{Tratamiento}$) y la media del peso de los tumores en los animales placebos ($P_{Placebo}$):

$$E_{Tratamiento} = 1 - (P_{Tratamiento} / P_{Placebo}) \quad (1)$$

15 El efecto esperado ($E_{Teórico}$) en el caso de las preparaciones de doble combinación puede calcularse para el caso de que ambos efectos no sean mutuamente excluyentes (Caridad W. Guerra Bustillo, Ernesto Menéndez Acuña, Rolando Barrero Moreña, Esteban Egaña Morales: "Estadística", *Editorial Pueblo y Educación*, 1989) según la formula:

20

$$E_{Teórico} = E_{T1} + E_{T2} - (E_{T1} * E_{T2}) \quad (2)$$

donde: E_{T1} es el Efecto del tratamiento 1 y E_{T2} es el efecto del tratamiento 2.

Como se puede apreciar en la Tabla No 1, el efecto experimental obtenido para las combinaciones (preparaciones combinadas) es superior al efecto teórico o 25 esperado, quedando demostrado el efecto sinérgico de estas combinaciones en la reducción de la masa tumoral.

Tabla No 1: Efecto de los diferentes tratamientos, en ratas Copenhagen implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G, al sacrificio después de 30 3 meses de la primera inmunización.

Tratamiento	Peso del tumor (g) (Media de 10 animales)	Efecto del Tratamiento	Efecto teórico
Castrados	9,20	0,707	-
Placebo	31,41	0,000	-
DES	12,66	0,597	-
D3-1	19,31	0,385	-
hrEGF-P64	25,43	0,190	-
hVEGF-KLH	21,72	0,309	-
D3-1 + hEGFr-P64	12,14	0,613	0,502
D3-1 + hVEGF-KLH	10,87	0,654	0,575

5

10



Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB

REIVINDICACIONES

COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.

5

1. Combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias, mediante administración simultánea, separada o secuencial, caracterizada porque incluye un compuesto A y un compuesto B, donde A y B son seleccionadas del grupo de moléculas consistentes en:

10 A:

- a.1. GnRH, o sus análogos, o anticuerpos anti-GnRH, o el receptor de GnRH (GnRH-R) o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o anticuerpos anti-GnRH-R, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- a.2. Gonadotropinas naturales o recombinantes, o sus análogos, o sus variantes mutadas, acopladas o no a una proteína portadora inmunopotenciadora, anticuerpos anti-Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- a.3. Receptores de Gonadotropinas hipofisarias, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- a.4. Anticuerpos anti-receptor de Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

B:

- b.1. EGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de EGF o análogos de EGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- b.2. Anticuerpos anti-EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.3. Receptor de EGF (EGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- b.4. Anticuerpos anti receptor de EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.5. VEGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de VEGF o análogos de VEGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- b.6. Anticuerpos anti-VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
 - b.7. Receptores de VEGF, o sus variantes mutadas o péptidos derivados de los receptores de VEGF acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 5 b.8. Anticuerpos anti receptor de VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.9. TGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de TGF o análogos de TGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 10 b.10. Anticuerpos anti-TGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.11. Receptor de TGF (TGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
2. Combinaciones de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizadas porque las moléculas de los grupos A ó B son acopladas a la proteína portadora inmunopotenciadora mediante conjugación o mediante la formación de proteínas químéricas.
- 15 3. Combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque el péptido análogo de GnRH tiene la secuencia pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly, acoplada a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 20 4. Combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína portadora inmunopotenciadora es seleccionada de las proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* P1 y P64.
5. Combinaciones de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína portadora inmunopotenciadora es un epítope T helper del toxoide tetánico (TT).
- 25 6. Combinaciones de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína conjugada o químérica es una de las variantes siguientes:
 - (a) GnRH unida a una proteína portadora y a EGF.
 - (b) GnRH unida a una proteína portadora y a VEGF.
- 30 (c) GnRH unida a una proteína portadora y a TGF.
- (d) GnRH unida a una proteína portadora a EGF y a TGF.
 - (e) GnRH unida a una proteína portadora a VEGF y a EGF.

7. Un método para la generación de respuesta inmune combinada caracterizado porque comprende el tratamiento con una de las combinaciones terapéuticas definidas en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6.
8. Un método según la reivindicación 7 caracterizado porque las combinaciones pueden ser aplicadas de forma simultánea, separada o secuencial.

10

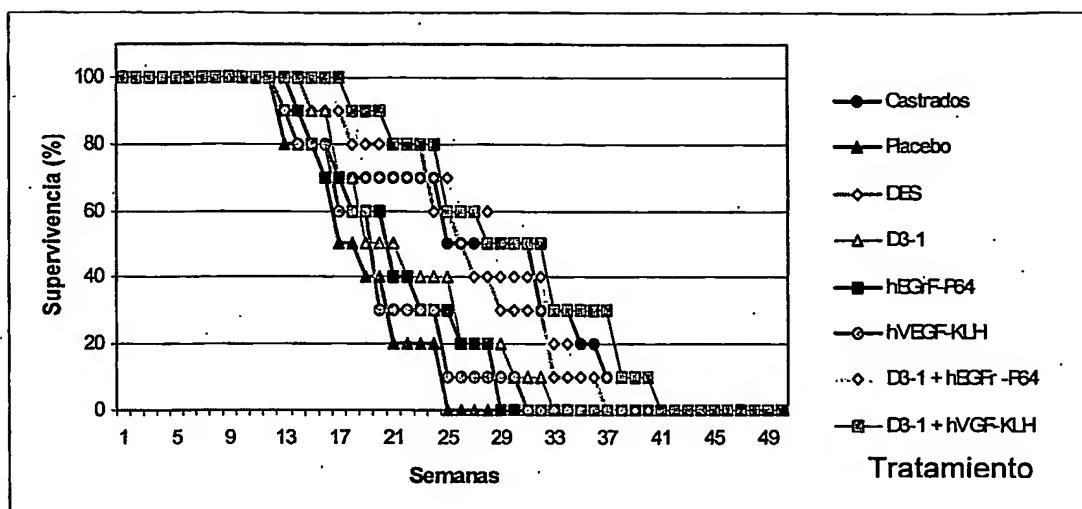
15

20

Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB



Fig. 1



5

